

Beitrag zur Frage der kulturellen  
Unterscheidung der Paratuberkelbakterien  
von anderen pathogenen Mycobakterienarten

Engelbert Fiehl



Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München  
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

---

BEITRAG ZUR FRAGE DER KULTURELLEN UNTERSCHIEDUNG  
DER PARATUBERKELBAKTERIEN VON ANDEREN  
PATHOGENEN MYCOBAKTERIENARTEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität  
München

von  
Engelbert Fiehl  
aus  
Kleinaitingen (Bayern)

München 1959



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Zipf  
Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 27. Februar 1959

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

## Meinen lieben Eltern



# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

|                                                                                                                                                                                                                      | Seite: |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| I. Einleitung                                                                                                                                                                                                        | 1      |
| II. Literatur                                                                                                                                                                                                        | 2      |
| A. Die Züchtung von Mycobakterium paratuberculosis                                                                                                                                                                   | 2      |
| 1) Das kulturelle Verhalten                                                                                                                                                                                          | 2      |
| 2) Die Bedeutung des Wachstumsfaktors                                                                                                                                                                                | 7      |
| B. Zur in vitro-Bestimmung der Virulenz von Mycobakterien                                                                                                                                                            | 8      |
| 1) Die Cordbildung in der Mikrokultur                                                                                                                                                                                | 8      |
| 2) Der Neutralrottest nach Dubos                                                                                                                                                                                     | 11     |
| III. Eigene Untersuchungen                                                                                                                                                                                           | 14     |
| A. Untersuchung über die Wachstumsintensität und die kulturellen Eigenschaften von Paratuberkelbakterien und Tuberkelbakterien auf Petagnani- und Hohn-Gottsackernährböden und die Möglichkeit ihrer Differenzierung | 14     |
| B. Züchtung und Wachstum von Paratuberkelbakterien auf Membranfiltern                                                                                                                                                | 17     |
| 1) Vorversuch                                                                                                                                                                                                        | 17     |
| 2) Hauptversuch                                                                                                                                                                                                      | 21     |
| C. Das Verhalten der Paratuberkelbakterien im Neutralrottest nach Dubos                                                                                                                                              | 24     |
| D. Die Züchtung von Mycobakterium paratuberculosis und der Erreger der Warmblütertuberkulose in der "Tiefenkultur" unter Beachtung ihrer kulturellen Differenzierungsmöglichkeit                                     | 27     |
| IV. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlußfolgerung                                                                                                                                                               | 30     |
| V. Literaturverzeichnis                                                                                                                                                                                              | 31     |
| Lebenslauf                                                                                                                                                                                                           | 37     |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41555228\\_0036](https://archive.org/details/IA41555228_0036)

## I. E I N L E I T U N G

In Europa ist seit mehr als 100 Jahren eine Krankheit bei Rind und Schaf bekannt, die durch chronischen Durchfall gekennzeichnet ist und mit hochgradiger Abmagerung einhergeht. Der chronische Verlauf und die jeder Behandlung trotztende Hartnäckigkeit dieser Darmkrankheit wiesen von vornherein auf ihre aetiologische Sonderstellung hin.

Der zuerst von John e und Fro thingham (27) 1895 beschriebene Erreger erwies sich als eine besondere Art der Gattung Mycobakterium und ist 1923 von Berg ey (5) als Mycobakterium paratuberculosis benannt worden.

Da man heute die Erreger der Paratuberkulose und der Tuberkulose auf Spezialnährböden züchten kann, ist es möglich, das kulturelle Verhalten der einzelnen Arten zu erforschen und miteinander zu vergleichen.

Mit den kulturellen Differenzierungsmöglichkeiten der Paratuberkelbakterien von anderen pathogenen Mycobakterienarten befaßt sich, auf Anregung von Herrn Professor Dr. Meyn , die vorliegende Arbeit.

## II. L I T E R A T U R

### A. Die Züchtung von *Mycobakterium paratuberculosis*

#### 1) Das kulturelle Verhalten

Die Züchtung von *Mycobakterium paratuberculosis* bereitete längere Zeit hindurch große Schwierigkeiten. So gelangte trotz zahlreichen Züchtungsversuchen mit verschiedenen Medien Bang (3) zu keinem positiven Ergebnis.

Brugge und Albien (12) veröffentlichten 1910, daß sie Reinkulturen aus Mesenteriallymphknoten paratuberkulöser Rinder gezüchtet haben. Als Nährboden diente Glycerinagar mit Nährstoff Heyden (aufgeschlossenes lösliches Albumin aus Hühnereiweiß).

Mit größerer Regelmäßigkeit gelang es aber erst Twort und Ingram (49) 1910, Paratuberkelbakterien auf einem besonderen Eiernährboden zu züchten. Dem Nährboden fügten sie vor dem Erstarren 4 % Glycerin und 0,5 - 1,0 % abgetötete Tuberkelbakterien zu. In den folgenden Jahren (1912 - 1913) konnten sie feststellen, daß sich als wachstumsfördernder Zusatz anstelle der Tuberkelbakterien auch apathogene *Mycobakterien* eigneten. Sie verwendeten hierzu *Mycobakterium phlei*. Es gelang ihnen auch, diesen Wachstumsfaktor mit verschiedenen Lösungsmitteln aus den Bakterienkörpern zu extrahieren und den Extrakt dem Nährboden anstelle der Bakterien mit Erfolg beizufügen.

Von den Tuberkelbakterien erwiesen sich die humanen Tuberkelbakterien am wirkungsvollsten, während Geflügel- und Rindertuberkelbakterien ungeeignet waren. Twort und Ingram (49) beobachteten auch damals schon, daß das *Mycobakterium paratuberculosis* dazu akklimatisiert werden kann, ohne die wachstumsfördernde Substanz der säurefesten Bakterien auf Eidotternährböden zu wachsen.

Holth (27) erzielte 1912 bei Versuchen mit sieben verschiedenen Nährböden das beste Wachstum bei Erstkulturen auf einem Nährboden, der sich aus erhärtetem Blutserum mit Zusatz von 1/4 Vol. Leberbouillon, 2 % abgetöteten humanen Tuberkelbakterien und 4 % Glycerin zusammensetzte. Nach 6 Wochen wurden die ersten Kolonien, die über den ganzen Nährboden verteilt waren und rasch an Größe zunahmen, eben sichtbar. Bei weiteren Untersuchungen über die Wachstumsverhältnisse erwies sich die Anwesenheit von abgetöteten Tuberkelbakterien als störend. Daher wurde ein Glycerinextrakt mit wesentlich besserem Erfolg angewandt.

Mc Fadyean (16) empfiehlt 1912 einen Glycerin-Tuberkulinagar unter Ver-

wendung von bovinen oder humanen Kulturen. Er steht damit im Gegensatz zur Meinung von T w o r t , daß nämlich bovine Tuberkelbakterien als Wachstumsfaktor ungeeignet sind.

1932 konnte M e y e r (32) Paratuberkelbakterien auf einem Nährboden züchten, der gleiche Teile Tuberkulin und Glycerin-Rindfleischbrühe mit 2 % Agar enthielt und unter Zusatz von Rinderserum erstarrte. Als Wachstumsfaktor wurde ein Glycerinextrakt aus Tuberkelbakterien oder Bakterium phlei zugesetzt. Die Kulturen wuchsen langsam und nur bei 37° C. Ihre runden, trocken aussehenden Kolonien konfluieren gewöhnlich nicht. Die Züchtung auf gewöhnlicher Glycerin-Bouillon gelang A n d e r s e n (2) im Jahre 1918. Es bildeten sich auf der ganzen Bouillonoberfläche stark gefaltete, dicke, warzenähnliche Häute. Die Züchtung soll nach Verfasser besser gelingen, wenn über der Nährbodenoberfläche eine größere Menge Luft steht.

Der Tuberkulinagar nach M c F a d y e a n wurde von B o n g e r t (9) 1922 als der am besten geeignete Nährboden empfohlen.

Im Jahre 1926 züchtete M e y e r (33) Paratuberkelbakterien auf festen und flüssigen Nährböden, die Glycerinextrakte oder Bakterium phlei enthielten. Am besten eignete sich ein Timothee-Glycerinagar mit Zusatz von Rinderserum. Das Wachstum war anfangs langsam. Doch nach weiteren Überimpfungen stellte sich in der vierten Generation nach 6 Wochen ein üppiges Wachstum mit klumpigen, gelben Kulturen ein.

1928 versuchten M i e s s n e r und B e r g e (37) das Mycobakterium paratuberculosis aus pathologisch veränderten Teilen der Darmschleimhaut und aus Stückchen der dazugehörenden Lymphknoten zu züchten. Zunächst bereiteten sie eine Tuberkelbakterienkulturabschwemmung, der sie nach dreimaliger Sterilisation im Autoklaven einen Liter flüssigen Glycerinagar zusetzten. Nach nochmaliger Sterilisation füllten sie den Nährboden in Röhrchen ab und setzten Rinderserum dazu und zwar auf 5 ccm je 0,5 ccm Serum. Die fertigen Nährböden wurden nun durch 24-stündiges Bebrüten im Thermostaten auf Sterilität geprüft. Das keimhaltige Material verimpften sie teils frisch und teils, nachdem sie es vorher mit 30 - 50 %iger Antiforminlösung 2 Stunden vorbehandelt hatten. Nach 8 Wochen Bebrütung zeigten sich nur auf einem Nährboden, der mit vorbehandeltem Material beimpft worden war, kleine mit dem Auge kaum wahrnehmbare, trockene Kolonien. Bei einem weiteren Versuch wurde das keimhaltige Material mit 12 %iger Schwefelsäure 20 Minuten vorbehandelt. Auch hier wuchs nur in einem Röhrchen eine Kolonie, deren kulturelle Eigenschaften nicht beschrieben wurden.

B o q u e t (11) verwandte 1928 den Nährboden nach S a u t o n , den er mit Ammo-

niak auf  $p_H$  7, 2 einstellt und einen Timothee-Bakterienextrakt zusetzt.

Der synthetische Nährboden nach Sauton hat folgende Zusammensetzung:

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Asparagin         | 4,0 g    |
| Glycerin          | 60,0 g   |
| Natr. citr.       | 2,0 g    |
| Aqua dest. ad.    | 1000,0 g |
| $K_2HPO_4$        | 0,5 g    |
| $MgSO_4$          | 0,5 g    |
| Eisenammon. citr. | 0,05 g   |

Am meisten entspricht das Asparagin dem Nährstoffbedarf der Paratuberkelbakterien. Es kann aber durch Leuzin ohne erhebliche Wachstumsverminderung ersetzt werden. Die Mineralbestandteile sind unentbehrlich für die Vermehrung der Bakterien. Das Eisenammoniumcitrat kann durch gleiche Teile Eisenlaktat oder Magnesiumlaktat ersetzt werden.

Herstellung des Timothee-Bakterienextraktes:

Zu 100 ccm 20 %iger Glycerinlösung in 0,8 %iger NaCl-Lösung werden 10 g getrocknete und fein verriebene Timotheebakterien von 2 Wochen alten, auf Glycerinbouillon gewachsenen Kulturen gegeben. Eine Stunde auf die Temperatur von  $120^{\circ}C$  erhitzen und dann absetzen lassen. Vom Obenstehenden, das abgegossen wird, werden 10 ccm zu 90 ccm Sauton<sup>o</sup> hinzugefügt. Es folgt das Abfüllen in Röhrchen und das Sterilisieren bei  $110^{\circ}C$  15 Minuten lang. Das Wachstum eines überimpften dünnen, jungen Häutchens beginnt auf diesem Nährmedium bereits nach 4 - 5 Tagen. Nach 4 Wochen bedeckt ein dünner Überzug die ganze Oberfläche. Nach 2 - 3 Monaten hat die Kultur ihre maximale Entwicklung erreicht. Für einen Kolben mit 120 ccm Nährlösung bei einem Zusatz von 10 % Timotheebakterien soll die Ernte 5 - 6 g Bakterien betragen. Der Ertrag ist geringer, wenn weniger Bakterienextrakt der Nährlüssigkeit zugefügt wird. Auf Kartoffelstücken, die in Sautonsche Nährlüssigkeit eingetaucht waren, entwickelte sich das Paratuberkelbakterium noch schneller als auf flüssigen Nährböden.

Ein dickes, warziges Wachstum erhält man schon nach 3 - 5 Wochen. Schon nach 6 - 8 Tagen bildet sich auf der Nährlüssigkeit, die den Kartoffelkeil umgibt, ein feines Häutchen. Die Empfindlichkeit der Bakterien auf die Reaktion des Nährbodens ist nicht erheblich. Boquet (11) fand keine Wachstumsverschiedenheiten bei Kartoffelkulturen in Sautons Nährlüssigkeit bei  $p_H$ -Werten von 6,8 - 8,0. Die Nährlüssigkeit wird während des Wachstums sauer (nach 4 Wochen  $p_H$  6, nach 8 Wochen  $p_H$  4,9). Das Temperaturoptimum beträgt  $38^{\circ} - 39^{\circ}C$ . Ein Wachstum ist möglich bis zu  $43^{\circ} - 44^{\circ}C$  und hört auf bei

46° - 48° C. Die Reinzüchtung aus verunreinigtem Material gelang Boquet (11) nach einer Behandlung mit 4 %iger Lauge auf Kartoffeln in Sautons Nährflüssigkeit.

Von Lange und Pescatore (31) wurden 1937 umfangreiche Versuche über die Gewinnung von Reinkulturen des Paratuberkelbakteriums gemacht. Ungefähr 40 Nährböden wurden auf ihre Brauchbarkeit hin überprüft. Es wurden die für die Tuberkelbakterien gebräuchlichen Nährböden, teilweise mit verstärktem Alkalizusatz, verwendet. Bei den ersten 18 Fällen gelang es nicht, Wachstum auf künstlichen Nährböden zu erzielen. Dagegen fielen die Züchtungsversuche bei den letzten 7 Fällen aufeinanderfolgend positiv aus. Auch flüssige Nährböden wurden verwendet, bei denen durch einen Vaseline Spiegel mit Natriumsulfit-Zusatz anaerobe Bedingungen geschaffen wurden. Den Nährböden wurden nach den Angaben von Twort und Ingram (49) Filtrate von Timotheebakterien zugefügt. Außerdem wurden Extrakte aus erkrankten Schleimhautteilen des Darmes verwandt. Eine eisenhaltige Bouillon wurde mit und ohne Timotheefiltrat geprüft. Der Glyzerinzusatz wurde abgestuft und einigen Nährböden Traubenzucker, Blut, Serum und Galle zugefügt. Alle diese Kulturen wurden 5 - 6 Monate überwacht. Es blieb jedoch eine Kolonienbildung aus, obwohl mikroskopisch in mehreren Fällen eine Vermehrung der Bakterien feststellbar war. Erfolgreich wurden die Züchtungsversuche erst dann, als die festen Nährböden von Dunkin (14) und Rinjard (45) unter Timothee-Extrakten verwandt wurden.

Bei der Herauszüchtung von Reinkulturen mußte das veränderte Darmmaterial zur Abtötung saprophytärer Keime einer Vorbehandlung mit Antiformin, Salz- oder Schwefelsäure unterzogen werden. Antiformin wurde in verschiedenen Konzentrationen, 10 - 40 %ig und mit verschiedenen langer Einwirkungsdauer, 10 Minuten bis 2 Stunden verwandt. Am häufigsten wurde 25 %iges Antiformin mit einer Einwirkungsdauer von 20 - 50 Minuten gewählt. Salzsäure wurde in 15, 25 und 30 %iger Konzentration mit einer Einwirkungsdauer von 15 - 60 Minuten angewandt, weiterhin Schwefelsäure 12 %ig und Kalilauge 10 %ig 20 Minuten lang. Das Antiformin wird als den anderen Mitteln überlegen bezeichnet. Zur Herauszüchtung sind Nährböden ohne Timothee-Extrakt ungeeignet. Die festen Nährböden nach Dunkin und Rinjard mit Extrakten von säurefesten Bakterien haben sich als sehr brauchbar erwiesen. Es müssen jedoch beide Nährböden herangezogen werden, da erfahrungsgemäß einzelne Stämme bei der Erstherauszüchtung nur auf einem der beiden angehen. Auch zur Weiterzüchtung sind diese Nährböden besonders geeignet.

Auf flüssigen Nährböden haben die frisch herausgezüchteten Stämme, abgesehen von ihrem guten Wachstum auf dem flüssigen Nährboden nach Boquet

(11), nur dünne Beläge ergeben. Eine allmähliche Anpassung an die einzelnen Nährböden ist im allgemeinen unverkennbar, doch fanden sich auch Ausnahmen. Man muß also auch zur Weiterzüchtung mindestens zwei verschiedene Nährböden benützen.

Pescatore (40) berichtet 1949 über die Weiterzüchtung von 14 Paratuberkulosestämmen. Schwierigkeiten bereitet nur die Erstherauszüchtung. Ist jedoch einmal ein gut bewachsenes Röhrchen erzielt, dann ist die Weiterzüchtung nicht schwieriger als bei Tuberkulosestämmen. Die regelmäßige Weiterimpfung, etwa alle 8 Wochen, ist Voraussetzung. Die Weiterimpfung erfolgt ausschließlich auf dem festen Nährboden nach Dunkin (15) (mit Timothee-Extrakt) und auf einem Kartoffelnährboden mit synthetischer Nährflüssigkeit (Sauton) bis etwa zu einem Drittel der Höhe des Kartoffelkeils. Der Nährboden nach Rinjard (45) hat den Nachteil, daß durch den Serumzusatz der Nährboden leichter Verunreinigungen ausgesetzt ist als der Dunkin-Nährboden mit starker Gentianaviolettlösung.

Zur Weiterzüchtung auf flüssigen Nährböden wird von Pescatore nur das Medium nach Boquet benützt, sowie gewöhnliche Sauton-Flüssigkeit.

Die Überimpfung von festen auf flüssige Nährböden und umgekehrt machte im Gegensatz zur Tuberkulose aber erhebliche Schwierigkeiten und versagte in zahlreichen Fällen.

Beim Vergleich des Wachstums von 14 Paratuberkulosestämmen auf zwei für Paratuberkulose bewährten Nährböden (Dunkin fest und Kartoffel mit Sauton) und auf für Tuberkelbakterien üblichen Nährböden (Petragnani, Petroff und Hohn-Substrat IV) ergab sich, daß das Wachstum von 13 Stämmen auf den Tuberkulosenährböden weit hinter dem auf Paratuberkulose-Nährböden zurückblieb. Nur ein Stamm zeigte in der 7. Generation ein dem auf Paratuberkulose-Nährböden entsprechendes üppiges Wachstum auf dem Nährboden nach Petragnani (39). Es wird daher nicht als ratsam angesehen, sich bei der Weiterzüchtung auf die Übertragung des Keimmaterials auf Tuberkulose-Nährböden zu verlassen.

Popp (44) untersuchte 1940 verschiedene Paratuberkulose- und modifizierte Tuberkulosenährböden auf ihre Tauglichkeit zur Herauszüchtung des Keimes aus paratuberkulöser Darmschleimhaut und zur Weiterzüchtung eines Laboratoriumsstammes. Als Aussaatmaterial diente ein paratuberkulös verändertes Darmstück einer Kuh, das mit einer 30 %igen Antiforminlösung vorbehandelt war. In 28 Versuchsreihen gelang Popp die Herauszüchtung nur auf dem, einen Extrakt von Timotheebakterien enthaltenden Nährboden nach Rinjard. 5 Wochen nach der Beimpfung zeigten sich auf der Oberfläche des Mediums zu-

sammenhängende matte Stellen, die in weiteren 14 Tagen zu kleinen, runzeligen Erhebungen von grauweißer Farbe auswuchsen.

Zur Weiterzüchtung eines Stammes eignete sich am besten der unter Verwendung von Leberbouillon (nach Lange und Peskatore) hergestellte Leberagar. Nach 4 Wochen zeigte sich geringes Wachstum, nach 5 Wochen ausgeprägtes und nach 6 Wochen sehr starkes Wachstum. Eine Modifikation des Nährbodens nach Petrangani, von Popp vorgenommen, war ebenfalls brauchbar.

1943 versuchten Albrecht und Nagel (1) auf Grund ihrer guten Erfahrungen mit Hohn-Substrat IV bei der Züchtung von *Mycobacterium tuberculosis* var. bov. diesen Nährboden auch zur Weiterzüchtung von *Mycobacterium paratuberculosis* zu verwenden.

Geprüft wurde der Laborstamm "Oslo". Nach anfänglichen Schwierigkeiten während der ersten beiden Passagen, in denen sich erst nach 4 - 6 Wochen Kulturen zeigten, wuchs der Stamm "Oslo" in der dritten Passage so kräftig, daß die Oberfläche in drei Wochen mit typischen Kolonien völlig bedeckt war. Nach 4 Passagen genügte ein 14-tägiges Bebrüten, um ein üppiges Wachstum zu erzielen. Zusätze von Extrakten oder pulverisierten Bakterienkörpern von humanen oder bovinen Tuberkelbakterien in Mengen von 1,5 % bzw. 10 % hatten keinen Einfluß auf das Wachstum des Paratuberkulose-Stammes. Durch eine Verdünnung des Substrates IV mit physiologischer NaCl-Lösung konnte eine Begünstigung der Kolonienentwicklung beobachtet werden.

## 2) Die Bedeutung des Wachstumsfaktors

Seit dem ersten erfolgreichen Züchtungsversuch von Twort und Ingram (49) ist bekannt, daß zur Züchtung von Paratuberkelbakterien und dies besonders bei der Erstzüchtung ein Wachstumsfaktor, der aus anderen *Mycobakterien* gewonnen werden kann, nötig ist. Im Laufe der Zeit wurde auch versucht, die wachstumsfördernde Substanz der säurefesten Bakterien in ihrem Wesen zu erkennen und ihre chemische Struktur zu ermitteln.

Nach Wooley und McCarter (54) soll Vitamin K mit dem Wachstumsfaktor identisch sein. Sie fanden, daß das Wachstum von Paratuberkelbakterien, die sich ohne Beisein von Extrakten aus *Mycobacterium phlei* entwickelten, durch 2 antihämorrhagische Verbindungen der Vitamingruppe K angeregt wird. Die beiden Stoffe sind Phthiocol und Methylnaphthachinon.

Franz u. a. (17) konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. Sie stellten aus einem Extrakt von *Mycobacterium phlei*, den sie aus größeren Bakterien-

mengen mit Hilfe von Methanol extrahierten, den wesentlichen Wachstumsfaktor in Form einer kristallinen Aluminiumverbindung und in einer amorphen metallfreien Verbindung chemisch rein dar. Die Menge der gewonnenen Substanz war wesentlich beeinflußt durch die Art des Nährbodens, in dem Mycobakterium phlei gezüchtet wurde. Der Ertrag war am größten, wenn ein Aufguß aus einem Rindfleischextrakt benützt wurde, der 4 % Pepton und 10 % Glyzerin enthielt. Die isolierte Substanz erwies sich als verantwortlich für den größten Teil, wenn nicht sogar für die Gesamtheit der wachstumsfördernden Aktivität, die einem einfachen Extrakt von Mycobakterium phlei innewohnt.

Da die typischen krankhaften Veränderungen der Johnsen Krankheit im Darm und in den dazugehörenden Lymphknoten ihren Sitz haben, versuchten T wort und I n g r a m (49) den Wachstumsfaktor daraus zu isolieren. Jedoch konnten sie keinen entsprechenden Einfluß auf die Kulturen von Paratuberkelbakterien feststellen. Sie nahmen daraufhin an, daß der Wachstumsfaktor von außen mit dem Futter in den Körper gelangt. Zahlreiche Wachstumsversuche mit alkoholischen Auszügen aus vielen Futtermitteln verliefen negativ. Nur die Auszüge von Lin sen, Weizen, Mais, Hafer und Tomaten riefen gesteigertes Wachstum hervor.

Franzis (17) und Mitarbeiter konnten mit einigen Futtermittelextrakten jedoch nur eine geringgradige Wachstumsstimulierung feststellen. Sie sind der Ansicht, daß dieser geringgradige Wachstumsreiz nicht mit dem gesuchten Wachstumsfaktor identisch ist.

Smith (46) prüfte Muskel-, Leber-, Pankreas- und Lymphknotenextrakte, Magen- und Darminhalt von 10 gesunden Kühen, von denen 5 mit frischem Gras und 5 mit Heu gefüttert waren. Weiterhin untersuchte er den Mageninhalt von 2 Kühen, die an Paratuberkulose verendet waren. Außerdem wurde der Magen- und Darminhalt von 3 Schafen, 3 Schweinen, 3 Pferden und 3 Kaninchen geprüft und darüber hinaus Extrakte von frischem Gras, Heu, Milch, Hafer, Weizen, Klee u. a. Durch keine der genannten Substanzen konnte bei Zusatz zum Nährboden aber eine sichtbare Wachstumsbegünstigung von Mycobakterium paratuberculosis erzielt werden.

## B. Zur in vitro-Bestimmung der Virulenz von Mycobakterien

### 1) Die Cordbildung in der Mikrokultur

Der Tierversuch war bis jetzt der übliche Weg, um die Virulenz pathogener Mikroorganismen zu bestimmen. In den letzten Jahren wurden aber auch einige in vitro-Teste beschrieben, mit deren Hilfe es möglich sein soll, virulente Mycobakterien zu erkennen. Eine dieser Methoden ist die Beobachtung der sogenann-

ten "Cordbildung".

Middlebrook (36) untersuchte die Wachstumsordnung von Mycobakterien in der Mikrokultur. Er konnte dabei in seinen Kulturversuchen feststellen, daß virulente Mycobakterien auf Serum-Albuminagar mit geringen Zusätzen von Tween 80 ein serpentinenartiges, geordnetes Wachstum erreichten, das er als Cordbildung (= Zopf bilden) bezeichnete. Nach seiner Ansicht ist die Cordbildung als sicheres Kulturmerkmal für die Virulenz von pathogenen Mycobakterien anzusehen.

Wie die Untersuchungen anderer Autoren aber zeigten, kann die Cordbildung auch noch von anderen Faktoren beeinflußt werden. So fanden Friedman und Russell (19) in Nährmedien mit Zusatz von Embryonalgewebe auch bei schwach- und avirulenten Tuberkelbakterienstämmen Zopfbildung und fassen sie deshalb als ein Merkmal auf, das nur vom Grad der Virulenz abhängig ist.

Nach den Untersuchungen von Meyn und Nestle (35) zeigen außer virulenten Tuberkelbakterien gelegentlich auch apathogene Mycobakterienarten in der Kultur eine Zopfbildung. Von 22 saprophytären Mycobakterienstämmen der Arten Lactiola und Phlebia ließen zwei Stämme diese Eigenschaft auf festen und flüssigen Nährböden erkennen. Es erscheint daher den Verfassern zweifelhaft, ob und in welchem Umfang Zusammenhänge zwischen Zopfbildung und Pathogenität der Mycobakterien bestehen.

Hellmann (25) konnte bei allen Mycobakterienarten in der Mikrokultur eine Cordformation feststellen. Sie wurde bei Mycobacterium tuberculosis allerdings regelmäßig beobachtet, während bei den saprophytären Keimen, bei aviären und Kaltblütertuberkelbakterien ausgeprägte Cordformationen oder Zöpfe in der Regel nur im Bereich von Flüssigkeitsansammlungen oder bei dünner Schichtdicke des Mediums auftraten. Auf Grund seiner Untersuchungen glaubt Hellmann, daß die Stärke der Haftfähigkeit der Keime mit dem Grad der Zopfbildung in Beziehung steht. Die geringeren Adhäsionskräfte bei den säurefesten Saprophyten würden demnach nur unter bestimmten Milieubedingungen eine Zopfbildung herbeiführen können, obwohl die Fähigkeit für Zopfbildung generell allen Mycobakterien eigen sei.

Nach den Untersuchungen von Goldman (21) kann die Cordbildung bei avirulenten Mycobakterien wie "radish bacillus" oder H37Ra je nach Bebrütungsdauer, Einsatzmenge und Medium positiv oder negativ sein.

Bloch (6) gewann 1950 aus lebenden Oberflächenkulturen von pathogenen cordbildenden Mycobakterienstämmen mit Hilfe von Petroläther einen lipoidhaltigen Stoff, den er als "Cord factor" bezeichnete. Dieser Stoff hemmte die

Leukozytenwanderung in vitro und war für Mäuse nach intraperitonealer Injektion schon in geringen Dosen toxisch. Wurden Mäuse mit 0,01 mg des lipoidhaltigen Extraktes 2 - 4mal intraperitoneal geimpft, so starben sie innerhalb von 4 Tagen. Nach Bloch (7) findet man bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung als konstanten und typischen Sektionsbefund ausgedehnte Hämorrhagien in der Lunge.

Philpot (41) impfte Mäuse ebenfalls mit verschiedenen Fraktionen. Die geimpften Tiere zeigten aber keinerlei Reaktion.

Daraufhin untersuchte Bloch (8) 7 verschiedene Mäusestämme auf ihre Empfindlichkeit gegenüber "cord-factor"-Injektionen und der Infektion mit virulenten Tuberkelbakterien (Stamm H37Rv). Hierbei stellte sich heraus, daß erhebliche Unterschiede in der Empfindlichkeit bei den verschiedenen Mäusestämmen bestehen. Außerdem waren "cord-factor" empfindliche Stämme mit virulenten Tuberkelbakterien infizierbar. Eine Ausnahme machte der Mäusestamm CFI. Diese Tiere waren sehr schwach "Cord-factor" empfindlich. Nur 10 % der geimpften Mäuse starben innerhalb von 14 Tagen. Nach den Untersuchungen von Pierce und Mitarbeiter (42) zeigen Mäuse, die mit virulenten Tuberkelbakterien infiziert werden, ebenfalls unterschiedliche Reaktionen.

Soskin (48) extrahierte aus jungen Tuberkelbakterien mit Hilfe von Petroläther eine geringe Menge lipoidhaltigen Materials. Wurde mit dem gereinigten Extrakt eine Injektion an Mäusen vorgenommen, so starben sie nach 10 - 14 Tagen an Hämorrhagien in der Lunge.

Pokorny (43) stellte den "cord-factor" nach Bloch (8) aus 10 - 14 Tage alten Kulturen des Stammes H37Rv, die auf flüssigem Nährboden nach Sauton gewachsen waren, her. Aus 10 g halbtrockener Bakterienmasse wurden ca. 50 mg Extrakt gewonnen, der 0,66 % Stickstoff enthielt und dessen Schmelzpunkt zwischen 31 - 32 °C lag. Eine Prüfung des lipoidhaltigen Stoffes an 10 Meerschweinchen und 20 weißen Mäusen ergab, daß der "cord-factor" mit der Virulenz der Bakterien nicht gekoppelt ist.

Noll und Mitarbeiter (38) konnten 1956 die chemische Struktur des Cordfaktors ermitteln. Nach ihren Angaben handelt es sich um ein Trehalose-6,6-dimycolate (1) mit der Summenformel  $C_{186}H_{366}O_{17} + CH_2$ .

Trotz dieser Untersuchungsergebnisse sprechen die folgenden Beobachtungen doch auch dafür, daß neben dem "cord-factor" noch andere Faktoren für die Zopfbildung wichtig sind.

Hellmann (25) führt die Cordbildung auf eine unterschiedliche Haftfähigkeit der Keime zurück. Die Haftfähigkeit bewirke, daß die nach der Teilung

vorliegende End-zu-End-Lagerung der Keime erhalten bleibt und in Verbindung mit mechanischen Einflüssen (Dichte des Mediums, Flüssigkeitsströmungen) die Parallel-Lagerung der Keime herbeiführt.

Goldman (21) konnte beobachten, daß der "cord-factor" nicht die einzige Ursache für die Cordbildung ist. Im Ziegenembryoextrakt konnte er eine hitze-labile, nicht dialysierbare Komponente feststellen, die auf das Wachstum eine stimulierende Wirkung ausübt. Ferner steigerte diese Substanz die Cordbildung des virulenten Stammes H37Rv und veranlaßte aber auch den avirulenten Stamm H37Ra zur Bildung von typischen Zöpfen. Durch Satellitismus von *Micrococcus epidermidis* in Kolonien von H37Ra wurde dieser Stamm ebenfalls zu typischem Cordwachstum angeregt. *Micrococcus epidermidis* säuert dabei den Nährboden während des Wachstums an. Jedoch war der niedere  $p_H$ -Wert allein nicht verantwortlich für die Cordbildung. Der aus *Micrococcus epidermidis* gewonnene Faktor war wie der im Ziegenembryoextrakt gefundene nicht dialysierbar; er verlor jedoch im Gegensatz zu jenem durch Autoklavieren bei  $110^{\circ}C$  (10 Minuten) seine Aktivität nicht.

## 2) Der Neutralrottest nach Dubos

Im Jahre 1948 wurde von Gardner, Dubos und Middlebrook (20) ein cytochemischer Test angegeben, mit dessen Hilfe es innerhalb von 2 - 3 Stunden gelingen soll, die Virulenz eines Tuberkelbakterienstammes zu bestimmen.

Bei Versuchen zur Ermittlung der zellulären Struktur von Tuberkelbakterien im Zusammenhang mit ihrer Virulenz konnten sie ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Neutralrot feststellen. Wurden nämlich virulente Tuberkelbakterien in alkalischer Neutralrotlösung suspendiert, so wurde ein Teil des Farbstoffes an die Tuberkelbakterien gebunden. Dadurch erschienen sie in ihrer Masse rot, während die überstehende Flüssigkeit gelb gefärbt blieb. Bei schwach- bzw. avirulenten Stämmen fanden sich alle Übergänge von rosa bis gelb.

Hein (25) untersuchte mit dem Neutralrottest nach Dubos 123 Stämme verschiedener pathogener Mycobakterien und außerdem 40 andere Bakterienstämme. Es ergab sich dabei, daß nicht säurefeste Keime Neutralrot-negativ reagieren, während bei den pathogenen Mycobakterienarten alle Übergänge von gelb bis rotviolett vorkommen. Das gleiche Ergebnis erhielt Viallier (52).

Hauduroy und Mitarbeiter (24) stellten bei ihren Nachprüfungen fest, daß sich 4 avirulente Stämme von Pseudotuberkelbakterien ebenfalls rot färbten.

Von Buchanan (13) wurden 121 virulente Tuberkelbakterienstämme, 2 Tuberkelbakterien-ähnliche avirulente Stämme, 6 chromogene Mycobakterienstämme und je ein Stamm von Vole- und BCG-Bakterien mit dem Neutralrottest untersucht. Die vorher im Meerschweinchenversuch als virulent erkannten Tuberkelbakterien gaben eine positive, die zwei avirulenten und sechs chromogenen Stämme eine negative Reaktion. 64 Stämme wurden mit einer modifizierten Neutralrotreaktion (Weglassen der zweimaligen Waschung mit Methylalkohol) untersucht. Dabei reagierten im Gegensatz zum Standardtest 2 drei Jahre im Laboratorium gehaltene Stämme negativ.

Nach Gardner, Middlebrook und Dubos (20) reagierte der virulente Standard-Stamm H37Rv im Neutralrottest positiv, während seine avirulente Variante der Stamm H37Ra negativ blieb.

Schrödter (48) führte den Neutralrottest an 100 Stämmen durch. Für Vergleichszwecke wurde eine Anzahl dieser Stämme mehrmals getestet. 29 Stämme prüfte sie im Tierversuch parallel zum Neutralrottest auf ihren Virulenzgrad. Als Kontrollstämme dienten bei jedem Test der Stamm H37Rv als virulenter und der Stamm H37Ra und Mycobacterium phlei als avirulenter Stamm.

Es färbte sich der Stamm H37Rv rot an, während Mycobacterium phlei ungefärbt blieb. Der Stamm H37Ra müßte, da er avirulent ist, ungefärbt bleiben. Trotzdem wurde aber eine Rotfärbung beobachtet. Im Tierversuch konnte dieser Stamm innerhalb von 80 Tagen keine makroskopisch erkennbare tuberkulöse Veränderung bei Meerschweinchen hervorrufen. Im flüssigen Nährsubstrat zeigten diese Keime nicht das für avirulente Stämme als typisch angegebene diffuse oder klumpige Wachstum sondern eine mehr geordnete Lagerung, wie sie in den "Cords" virulenter Stämme beobachtet wird. Auch der BCG-Stamm färbte sich wie virulente Stämme. Auch zeigte er im flüssigen Nährmedium ein Cordwachstum. Die im Tierversuch als virulent erkannten Stämme reagierten auch im Neutralrottest positiv, so daß der Test geeignet erschien, Aussagen über die Virulenz von Tuberkelbakterien zu machen.

Wayne (53) beschrieb eine Methode zur Kultivierung und Sichtbarmachung von Mycobakterien auf Molekular-Filtermembranen unter gleichzeitiger Anwendung des Neutralrottestes nach Dubos. Das Impfmateriel bestand aus einer Keimaufschwemmung der untersuchten Bakterien, die in Dubos Tween-Albuminnährboden wuchsen, oder aus homogenisierten Kolonien, gezüchtet auf Löwenstein-Jensen-Nährboden und suspendiert in einer 0,5 %igen Lösung von Rinderalbumin. Einige Filter wurden in der Weise beimpft, daß die Suspensionen die Filter (von Filterhaltern gehalten) passierten. Diese Blättchen wurden dann mit der beimpften Seite nach oben auf den Nährboden gelegt. Andere wurden zuerst auf den Nährboden gelegt und dann mit einem Tropfen

der Keimaufschwemmung beimpft. Es erwiesen sich beide Methoden als brauchbar. Da das Vorhandensein einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre wesentlich für das Wachstum auf Molekular-Filtermembranen ist, wurden in die Deckel der mit 12 ml Löwenstein-Jensen-Eiernährboden angefüllten Petrischalen kurz vor der Überimpfung mit Aqua dest. getränkte Fließpapierscheiben gelegt. Das erste Wachstum der Tuberkelbakterien konnte makroskopisch nach einer Woche, mikroskopisch bereits nach 4 - 6 Tagen festgestellt werden.

Die bewachsenen Filter wurden von der Nährbodenoberfläche abgehoben und die intakten Kolonien dann mit Hilfe eines modifizierten Neutralrottests nach Dubos (20) angefärbt.

Folgende Reagenzien wurden hierzu benötigt:

1. NR-G: Eine gesättigte Lösung von Neutralrot in 95 %igem Alkohol, gefiltert und mit 1 % HCl angesäuert.
2.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - developer: Eine 1 : 10 Verdünnung einer gesättigten wässrigen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung.
3. 95 %igen Alkohol.

Ein kleines Segment des Filters, das mit Kolonien bewachsen war, wurde herausgeschnitten und mit der bewachsenen Seite nach oben 20 - 30 Minuten auf einen Papierstreifen gelegt. Dieser wurde mit den Reagenzien in folgender Reihenfolge bis zur Sättigung getränkt:

1. NR-G: 10 Minuten (bis der Papierstreifen völlig rot war)
2.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - developer: 5 Minuten (der Papierstreifen färbte sich bernsteingelb)
3. 95 %iger Alkohol: 1 Minute (entfernt die überschüssigen Reagenzien).

Die gefärbten Filtersegmente wurden in "Permout mounting fluid" getrocknet und für die mikroskopische Untersuchung transparent gemacht. Es zeigte sich, daß cordingbildende Mycobakterien sich rot anfärbten. Die 2 untersuchten Paratuberkulosestämmen waren cord- und Neutralrot-positiv.

### III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Bei allen hier beschriebenen Versuchen fanden Laborstämme des Tierhygienischen Instituts München Verwendung.

#### A. Untersuchung über die Wachstumsintensität und die kulturellen Eigenschaften von Paratuberkelbakterien und Tuberkelbakterien auf Petagnani- und Hohn-Gottsacker-nährböden und die Möglichkeit ihrer Differenzierung

##### Material und Methodik

Es wurden 9 Paratuberkulose-, 2 humane, 2 bovine und 4 Geflügelstämme geprüft.

Als Nährmedien dienten die Eiernährböden nach Hohn-Gottsacker und Petagnani sowohl in Originalform als auch in folgenden 3 Modifikationen:

1. Petagnani ohne Glyzerin
2. Petagnani mit Glyzerin und Phleiextrakt
3. Petagnani ohne Glyzerin und mit Phleiextrakt

Die Herstellung der Nährböden erfolgte nach der Nährbodenrezeptur von Hallmann (23).

Herstellung des Phleiextraktes:

5 g Kulturmasse werden mit 30 ccm einer 20 %igen Lösung von Glyzerin in Aq. dest. homogen verrieben. Die Keimsuspension wird 45 Minuten auf  $80 - 100^{\circ} \text{C}$  erhitzt, anschließend zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit vom Bodensatz als Phleiextrakt abgegossen. Von diesem Extrakt wurden 0,5 % dem Nährboden zugefügt.

Um bei dem vergleichenden Versuch von allen Stämmen annähernd die gleiche Keimmenge überimpfen zu können, wurde von jedem Stamm eine Keimsuspension (5 mg/ccm) hergestellt, von der jeweils ein Tropfen unter Verwendung der gleichen Öse auf den Nährboden gebracht wurde. Die Herstellung der Keimsuspension erfolgte folgendermaßen: Auf einer Mikrowaage wurden in einem dickwandigen Zentrifugenglas 20 mg Keimmaterial abgewogen und anschließend mit 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Aufschwemmung wurde nach Zugabe von Glasperlen ca. 15 Minuten lang im Schüttelapparat homogenisiert.

Die beimpften Röhrchen wurden mit Ceresinstopfen verschlossen und bei  $38^{\circ} \text{C}$  bebrütet. Nach 4 Wochen wurden sie abgelesen und ihr Wachstumsgrad nach

folgendem Schema beurteilt:

- ++++ = dichter Kulturrasen
- +++ = lockerer Kulturrasen, über 50 Einzelkolonien
- ++ = 11 bis 50 Einzelkolonien
- +
- = 1 bis 10 Einzelkolonien
- = keine sichtbaren Kolonien

### Untersuchungsergebnis

Bei den in Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnissen wurde jeweils von zwei bewachsenen Röhrchen der Mittelwert genommen.

Tabelle 1 Beurteilung der Wachstumsintensität nach einer Bebrütungszeit von 4 Wochen

| Stämme                      | Petrag.<br>orig. | Petrag.<br>ohne<br>Glyz. | Petrag.<br>mit<br>Glyz. u.<br>Phlei-<br>extrakt | Petrag.<br>ohne Glyz.<br>u. mit<br>Phlei-<br>extrakt | Hohn-Gottsacker |
|-----------------------------|------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------|
| Tuber-<br>kelbakt.          |                  |                          |                                                 |                                                      |                 |
| 99 human                    | ++               | +                        | +++                                             | +                                                    | +++             |
| i44B "                      | ++               | ++                       | +++                                             | ++                                                   | +++             |
| 110M bov.                   | +                | ++                       | +                                               | ++                                                   | -               |
| 204MS "                     | -                | +                        | +                                               | +                                                    | -               |
| Da38 aviär                  | ++++             | ++++                     | ++++                                            | +++                                                  | ++++            |
| Av 33 "                     | +++              | ++++                     | ++++                                            | ++++                                                 | ++++            |
| Av 5 "                      | ++++             | ++++                     | ++++                                            | ++++                                                 | ++++            |
| Av 6 "                      | ++++             | +++                      | ++++                                            | ++++                                                 | ++++            |
| Paratu-<br>berkel-<br>bakt. |                  |                          |                                                 |                                                      |                 |
| III                         | +++              | +++                      | ++                                              | +++                                                  | ++++            |
| IV                          | +++              | +++                      | +++                                             | +++                                                  | +++             |
| V                           | +++              | +++                      | +++                                             | ++                                                   | +++             |
| C 300                       | +++              | +++                      | +++                                             | +++                                                  | +++             |
| C. Hull                     | ++++             | +++                      | +++                                             | +++                                                  | +++             |
| 3384                        | +++              | ++++                     | +++                                             | +++                                                  | +++             |
| 1. 286                      | ++               | +++                      | ++                                              | +++                                                  | +++             |
| II/28/5                     | +++              | +++                      | +++                                             | ++                                                   | +++             |
| 3390                        | +++              | +++                      | +++                                             | +++                                                  | +++             |

Aus den in Tabelle 1 zusammengefaßten Untersuchungsergebnissen ergibt sich folgendes:

Auf das Wachstum der Paratuberkelstämmen hatte der Zusatz von Glycerin und, bzw. oder, Phleiextrakt keinen Einfluß. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß es sich um Laborstämmen handelte, die sich hinsichtlich ihrer Nährstoffbedürfnisse infolge mehrerer Passagen an die einfachen Eiernährböden gewöhnt hatten.

Die Kulturen der Paratuberkelbakterien hatten nach 3 -4 Wochen das Aussehen schmieriger Beläge, die hell- bzw. dunkelbraun gefärbt waren. Die schmierig-glatte Oberfläche wurde von der 3. Woche ab im allgemeinen etwas holprig, später oft feinkrümelig.

Bei humanen und bovinen Tuberkelbakterien beeinflusste der Glyzeringehalt der Nährböden das Wachstum deutlich. Der Zusatz von Phleiextrakt wirkte sich nicht aus.

Geflügeltuberkelbakterien wuchsen auf allen Nährböden gleich gut.

Im einzelnen entsprach das kulturelle Verhalten der Säugetier- und Geflügeltuberkelbakterien im wesentlichen den von Meyn (35) für die Typendifferenzierung von Tuberkelbakterien auf Petraganinährböden angegebenen Kulturmerkmalen.

" Typus humanus: üppiges (eugonisches), trocken-krümeliges, gelbliches Wachstum. Später Pigmentbildung. Erste Kolonien nach 2 - 3 Wochen sichtbar. Die Stämme wachsen auf glyzerinhaltigen Nährböden besser als auf glyzerinfreien.

Typus bovinus: Zartes (dygonisches), feucht-glänzendes, hellgelbes Wachstum. Keine Pigmentbildung. Die größte Zahl der Stämme wächst in der Erstkultur auf den glyzerinhaltigen Nährböden schlechter als auf den glyzerinfreien.

Typus gallinaceus: gutes (eugonisches), feucht-glänzendes Wachstum. Einzelkolonien kugelig. Später Ringbildung. Erste Kolonien nach 2 - 5 Wochen sichtbar. Die Stämme wachsen auf glyzerinhaltigen Nährböden besser als auf glyzerinfreien."

#### Differenzierungsmöglichkeit

Auf Grund der Wachstumsintensität und des Aussehens der Kulturen war es möglich, Paratuberkelbakterien und Geflügeltuberkelbakterien gegenüber humanen und bovinen Tuberkelbakterien in der Makrokultur auf Petraganin und Hohn-

Gottsackernährböden abzutrennen; eine sichere Unterscheidung von Paratuberkelbakterien und Geflügeltuberkelbakterien in der Makrokultur konnte aber im allgemeinen nicht vorgenommen werden. Zwei der vier untersuchten Geflügelstämme (Av 33, Av 5) zeigten in der 3. Woche die nach Meyn (35) für Geflügeltuberkel charakteristische Ringbildung und waren daran sicher von den Paratuberkelkulturen abzutrennen. Diese Ringbildung, bei der es sich um runde, ovale oder unregelmäßig geformte Kulturwälle handelte, die einen Durchmesser bis zu 0,5 cm erreichten, bildet aber andererseits kein konstantes Kulturmerkmal der aviären Stämme.

## B. Züchtung und Wachstum von Paratuberkelbakterien auf Membranfiltern

Da sich auf den herkömmlichen festen Tuberkulosenährböden die untersuchten Paratuberkulosestämmen makroskopisch nur von den humanen und bovinen Typen, nicht aber von den Geflügeltuberkelbakterien abtrennen ließen, sollte geprüft werden, ob nicht das Wachstum auf Membranfiltern bei mikroskopischer Betrachtung eine Unterscheidung ermöglichte.

### 1. Vorversuch

Zunächst wurde untersucht, unter welchen Voraussetzungen eine optimale Züchtung auf Membranfilterstreifen gelingt.

#### a) Material und Methodik

Membranfilter mit der Porengröße 0,1  $\mu$  (Hersteller: Membranfiltergesellschaft Sartorius, Göttingen) wurden in Streifen von ca. 1mal 2 cm Größe geschnitten und durch Einlegen in eine 4 %ige Formalinlösung keimfrei gemacht. Diese Streifen wurden unmittelbar bevor sie auf den Nährboden kamen, in steriler physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Die noch nassen Filter legen sich gut an die Nährbodenoberfläche an und haften dort fest. Im Gegensatz dazu knittern die im Autoklaven sterilisierten Filterstreifen sehr leicht, und es ist schwer, oft sogar unmöglich, sie auf der fast senkrechten Nährbodenoberfläche zum Haften zu bringen.

Von 9 Paratuberkulose-, 15 Geflügeltuberkulose-, 2 humanen und 2 bovinen Tuberkulosestämmen wurden, wie in der Versuchsreihe A, Keimaufschwemmungen hergestellt (Verdünnung 5 mg/ccm) und davon zwei Tropfen mit einer Öse auf Petragnaninährböden mit und ohne Malachitgrün gebracht. Die Beimpfung wurde folgendermaßen vorgenommen:

- a) 1 Tropfen der Keimaufschwemmung auf den Filter. Zum Vergleich des Keimwachstums 1 Tropfen auf den Nährboden in der Umgebung des Filters.
- b) 1 Tropfen auf die Nährbodenoberfläche, die dann mit einem Filterstreifen abgedeckt wurde.  
Zum Vergleich 1 Tropfen in die Umgebung des Filters.

Das Wachstum der Kulturen wurde nach 16 Tagen nach dem Schema auf Seite 16 beurteilt.

#### b) Versuchsergebnis

Die Ergebnisse der Züchtungsversuche sind in Tabelle 2 zusammengefaßt worden. Bei der Beurteilung des Wachstumsgrades wurde jeweils von zwei bewachsenen Röhrchen der Mittelwert genommen.

Tabelle 2 Beurteilung des Wachstumsgrades auf und neben den Membranfilter-Streifen nach 16-tägiger Bebrütung bei 38° C

| Stämme                              | Petragnani mit<br>Malachitgrün |    |                       | Petragnani ohne<br>Malachitgrün |      |          |
|-------------------------------------|--------------------------------|----|-----------------------|---------------------------------|------|----------|
|                                     | Beimpfung<br>nach Methode      |    | Wachstum<br>neben dem | Beimpfung<br>nach Methode       |      | Wachstum |
|                                     | a                              | b  | Filter                | a                               | b    | Filter   |
| Tuberkel-<br>bakterien              |                                |    |                       |                                 |      |          |
| H 39 (human)                        | -                              | -  | +                     | ++                              | ++   | ++       |
| Hu 144B "                           | -                              | -  | +                     | ++                              | ++   | ++       |
| Bov110M(bov.)                       | -                              | -  | +                     | ++                              | +++  | +++      |
| Bov204MS "                          | -                              | -  | ++                    | ++                              | ++   | ++       |
| Geflügel-<br>tuberkel-<br>bakterien |                                |    |                       |                                 |      |          |
| Av 1                                | +                              | +  | +++                   | +++                             | +++  | +++      |
| Av 2                                | +                              | +  | ++                    | +++                             | +++  | +++      |
| Av 4                                | ++                             | ++ | +++                   | ++++                            | +++  | +++      |
| Av 5                                | +                              | +  | +++                   | ++++                            | +++  | +++      |
| Av 6                                | +                              | +  | +++                   | +++                             | +++  | +++      |
| Av 7                                | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Av 8                                | ++                             | +  | +++                   | +++                             | +++  | +++      |
| Av 9                                | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Av 11                               | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Av 204                              | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Av 178                              | +                              | +  | ++++                  | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Av Q4                               | +                              | +  | +++                   | ++++                            | +++  | ++++     |
| Av 33                               | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Da 38                               | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| 131-AKa                             | ++                             | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| Paratuber-<br>kelbakt.              |                                |    |                       |                                 |      |          |
| III                                 | +                              | +  | +++                   | +++                             | +++  | +++      |
| IV                                  | +                              | +  | ++++                  | ++++                            | ++++ | ++++     |
| V                                   | +                              | +  | +++                   | +++                             | ++++ | +++      |
| 3384                                | +                              | +  | +++                   | +++                             | +++  | +++      |
| C. Hull                             | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| C. 286                              | +                              | +  | +++                   | ++++                            | +++  | ++++     |
| II/28/5                             | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| C. 300                              | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |
| 3390                                | +                              | +  | +++                   | ++++                            | ++++ | ++++     |

Aus den in Tabelle 2 zusammengefaßten Untersuchungsergebnissen ergibt sich folgendes:

Auf den Membranfilterstreifen zeigten nach 16-tägiger Bebrütung die Paratuberkelbakterien und die Geflügeltuberkelbakterien stets mehr oder weniger deutliches Wachstum. Bei den humanen und bovinen Stämmen trat Wachstum zunächst nur auf den Nährböden ohne Malachitgrün ein. Einzelkolonien auf den malachitgrünhaltigen Nährmedien waren bei diesen Stämmen erst nach 3 Wochen zu erkennen. Das Wachstum der "Filter"-Kulturen aller Stämme war auf Petragrani mit Malachitgrün deutlich geringer als auf Petragrani ohne Malachitgrün. Es war auch auffallend, daß auf dem Petragrani mit Malachitgrün in der Umgebung des Filters stärkeres Wachstum auftrat als auf den Filtern selbst. Dies war auf den Petragraninährböden ohne Malachitgrün nicht der Fall. Hier wuchsen die Keime sowohl auf dem Nährboden als auch auf dem Filter gleich stark. Für diesen Unterschied sind folgende Tatsachen verantwortlich:

- 1) Malachitgrün ist allgemein ein Farbstoff, der das Wachstum von Bakterien zu hemmen vermag.
- 2) Bei der Züchtung der "Filter"-Kulturen wurde beobachtet, daß sich die Filter auf Petragrani mit Malachitgrün gegenüber der Nährbodenoberfläche stärker grün anfärbten. Entfernte ich die Filterstreifen, so war der darunter liegende Teil des Nährbodens nicht mehr grün sondern gelb, und zwar war die Entfärbung nicht nur oberflächlich, sondern sie ging, wie es ein Querschnitt zeigte, in die Tiefe.

Offensichtlich saugen die Filter das Malachitgrün aus dem Nährboden auf und reichern sich sehr stark damit an. Der verstärkte Malachitgrüngehalt der Filterstreifen bewirkte aber eine stärkere Wachstumshemmung der Bakterien als der normale Farbstoffgehalt des Nährbodens. Da eine Hemmung des Wachstums auf dem Filter bei Kulturen auf Petragrani ohne Malachitgrün nicht zu beobachten war, konnte der Filter selbst als Ursache der Wachstumshemmung bei pathogenen Mycobakterien nicht in Frage kommen. Will man also ein optimales Keimwachstum auf Membranfiltern erzielen, ist es vorteilhaft, den Malachitgrünzusatz zu den Petragraninährböden wegzulassen. Außerdem eignen sich die auf diesem Nährboden farblos gebliebenen Filter auch besser für die mikroskopische Untersuchung. Als Nachteil wurde empfunden, daß die Petragraninährböden ohne Malachitgrün leichter verunreinigten.

## 2. Hauptversuch

### a) Material und Methodik

Die Versuche wurden nach der im Vorversuch ermittelten Methode mit Petragnaninährböden ohne Malachitgrün an denselben Stämmen durchgeführt.

Von jedem Stamm wurde eine Keimaufschwemmung (ca. 5 mg/ccm) hergestellt und davon mit einer Öse 1 Tropfen auf den Filter gebracht. Die beimpften Röhrchen wurden mit Ceresinstopfen verschlossen und bei 38 °C bebrütet. Das primäre Wachstum wurde mit Hilfe eines Plattenmikroskops festgestellt und die Wachstumsformen bei den Paratuberkulose- und Geflügelstämmen nach 3 - 4, bei den humanen und bovinen Stämmen nach 7 - 8 Tagen beurteilt.

Um die Keimanordnungen auf den bewachsenen Filterstreifen deutlich sichtbar zu machen, wurden die Streifen folgendermaßen nach Ziehl-Neelsen gefärbt:

1. Die Filterstreifen wurden vorsichtig mit einer Öse von der Nährbodenoberfläche abgehoben und auf einen Objektträger gebracht. Dieser wurde einige Male durch die kleingestellte Bunsenflamme gezogen und dadurch die Keime auf dem Filter fixiert. (Langsames Erhitzen war unbedingt nötig, da sich sonst die feuchten Filter stark wellten und die Form der Primärkolonien verändert wurden.)
2. Nun wurden die Filter 15 Minuten lang in eine bis zur Dampfbildung erhitzte Karbol-Fuchsinlösung eingelegt. (Aufkochen der Farblösung muß vermieden werden, da die Filter sehr darunter leiden.)
3. Entfärben mit HCl-Alkohol etwa 20 Minuten lang. Vollkommenes Entfärben der Filter wurde auch bei längerer Einwirkung des HCl-Alkohols nicht erreicht.
4. Gegenfärbung mit Methylenblau (30 Sekunden). Abspülen mit Aqua dest. , bis der Filter kein Methylenblau mehr abgibt (etwa 10 Minuten).

Um die gefärbten Filter für die mikroskopische Untersuchung geeignet zu machen, wurden sie auf einen Objektträger gebracht, getrocknet, mit 1 - 2 Tropfen Immersionsöl transparent gemacht und mit einem Deckglas, das mit Wachs oder Klebstoff auf dem Objektträger befestigt wurde, abgedeckt.

Die mikroskopische Betrachtung erfolgte im Trockensystem und in der Ölimmersion. Die Beurteilung der Wachstumsformen erfolgt nach der von Hellmann (26) vorgenommenen Einteilung:

1. Streng "orientiertes", kompaktes Wachstum (+++)

Die Keimvermehrung erfolgt in Form von Zöpfen, die durch eine orientierte

und parallele Zusammenlagerung der Keime zustandekommen und in verschiedenen Größen vorliegen. Die entstehenden Kolonien sind sehr kompakt und lassen bis auf einzelne am Rand herausragende Stäbchen keine Einzelkolonien erkennen.

2. "Orientiertes", mehr diffuses Wachstum (++)

Es besteht eine ausgeprägte Tendenz zur strangartigen Zusammenlagerung der Keime. Die Bakterien bilden ausgerichtete Zellzüge. Die gesamte Kolonie hat ein grobmaschiges Aussehen, da die dünnen Keimstränge im allgemeinen ausgerichtet liegen und seitliche Abzweigungen selten sind. Gelegentlich kommen Kolonien vor, die aus kurzen, eng aneinanderliegenden Zöpfen bestehen. Die Kolonien verlieren dadurch ihr weitmaschiges Aussehen. Sie werden kompakter, und die einzelnen Keime sind nicht mehr zu erkennen.

3. Regelloses Wachstum, Glattform (+)

Die Keime liegen regellos dicht aneinander und bilden eine kompakte Kolonie, in der einzelne Keime nicht mehr zu erkennen sind.

b) Untersuchungsergebnis

Die Beurteilung der Wachstumsformen der einzelnen Arten ist in Tabelle 3 zusammengefaßt. Jeder Stamm wurde zweimal untersucht.

Tabelle 3 Zusammenstellung der Wachstumsformen von pathogenen Mycobakterienarten in der Mikrofilterkultur

| Stämme pathogener Mycobakterien | Wachstumsform |
|---------------------------------|---------------|
| Tuberkelbakterien               |               |
| Hu 39 (human)                   | +++           |
| Hu 144B "                       | +++           |
| Bov 110M (bovin)                | +++           |
| Bov 204MS "                     | +++           |
| Geflügeltuberkelbakterien       |               |
| Av 1                            | ++            |
| Av 2                            | ++            |
| Av 4                            | +             |
| Av 5                            | +             |
| Av 6                            | ++            |
| Av 7                            | +             |
| Av 8                            | ++            |
| Av 9                            | +             |
| Av 11                           | ++            |
| Av 204                          | ++            |
| Av 178                          | +             |
| Av-Q4                           | ++            |
| Av 33                           | ++            |
| Da 38                           | ++            |
| 131-A-Ka                        | ++            |
| 99-Ka                           | +             |
| W                               | ++            |
| 97-Ka                           | ++            |
| Paratuberkelbakterien           |               |
| III                             | ++            |
| IV                              | ++            |
| V                               | ++            |
| 3384                            | ++            |
| C. Hull                         | ++            |
| C. 286                          | ++            |
| II/28/5.                        | ++            |
| C. 300                          | ++            |
| 3390                            | ++            |

Die Untersuchungen über die Mikrokolonien mit gefärbten Membranfilterstreifen ergaben, daß alle Paratuberkulosestämmen eine gemeinsame Wachstumsform, das sogenannte "orientierte" Wachstum nach Hellmann aufwiesen. Ein ganz ähnliches Verhalten zeigten aber auch 12 der untersuchten aviären Stämme. Das von Hellmann (26) beschriebene regellose Wachstum, das für die Glattform typisch sein soll, trat nur bei 6 Stämmen auf. Eine Differenzierung von den Paratuberkulosebakterien war deshalb nur bei diesen Stämmen möglich.

Im Gegensatz zu den Geflügeltuberkelbakterien konnten die echten Tuberkulosebakterien von den Erregern der Johnsen Krankheit einwandfrei abgegrenzt werden. Die humanen und bovinen Stämme zeigten eine deutliche Zopfbildung und unterschieden sich damit von den anderen Mycobakterienarten.

### C. Das Verhalten der Paratuberkelbakterien im Neutralrottest nach Dubos

Der Neutralrottest nach Dubos (20) ist eine cytochemische Reaktion, die als Virulenztest verwendet wird. Auf die Schwierigkeit, eine solche in vitro-Reaktion tatsächlich als Gradmesser für die Virulenz anzusehen, wurde bereits in der Literaturbesprechung hingewiesen. Da sich die humanen und bovinen Tuberkelbakterien aber im allgemeinen Neutralrot-positiv verhalten, sollte untersucht werden, ob sich diese Reaktion unter Umständen für eine Differenzierung der Paratuberkelbakterien von den anderen säurefesten Mikroorganismen eignet.

#### a) Material und Methodik

2 humane, 2 bovine, 18 Geflügel-, 9 Paratuberkulose- und 10 pathogene Stämme wurden getestet.

Die pathogenen Mycobakterienarten wuchsen auf Petagnaninährböden. Ihre Kulturen waren beim ersten Test 3 Wochen und beim zweiten Test 5 Wochen alt.

Die apathogenen Stämme wurden auf Glycerin-Schrägagar gezüchtet und waren beim ersten Test 4 Tage und beim 2. Test 2 Wochen alt.

Durchführung des Neutralrottests nach Dubos (20):

Reagenzien: 1. Methylalkohol (50 %)

2. Lösung: NaCl (5 g) Natriumbarbiturat (1 g)

Aq. dest. q. s. 100 ccm p<sub>H</sub> 8,9

3. frische, wässrige Lösung von Neutralrot (1 %)

**Handhabung:** Eine Öse frischen Keimmaterials verreibt man mit einem Glasstab an der Wand eines Zentrifugenröhrchens bis Homogenität erzielt ist.

Zu den Keimen gibt man 2 - 3 ccm eines 50 %igen Methylalkohols und stellt die Röhrchen 45 Minuten lang in den Brutschrank bei einer Temperatur von 37<sup>0</sup> C. Anschließend daran kommen die Röhrchen etwa 20 Minuten bei 3000 U in die Zentrifuge. Nun wird der überstehende Alkohol abgegossen, der Bodensatz in 2 - 3 ccm physiologischer NaCl-Lösung nachgewaschen, wieder zentrifugiert, abgegossen und nochmals auf die gleiche Weise mit Alkohol gewaschen.

Nach der zweiten Waschung (mit Alkohol und anschließend mit physiologischer NaCl-Lösung) wird der Bodensatz in 2 ccm Aq. dest. suspendiert. Dazu fügt man sofort 1 ccm der alkalischen Lösung von Na-Barbiturat und 1 - 2 Tropfen der frischen Neutralrotlösung.

**Ablauf der Reaktion:**

Der Prozeß läuft gewöhnlich in 30 Minuten bei Zimmertemperatur ab. Nach dieser Zeit ist der Farbstoff, der in der Lösung bleibt, gelb, während im positiven Falle der an oder in den Zellen gebundene Farbstoff rot ist. Wenn das beim Test verwandte Neutralrot in der Keimaufschwemmung + alkalischer Lösung in einer Konzentration enthalten ist, in der das Verhältnis des Zellgewichts zur Farbmenge zu klein ist, wird der gesamte Farbstoff von den Zellen gebunden, d.h. die Zellen werden rot, die überstehende braune Flüssigkeit farblos. Die Menge des von den Bakterien gebundenen Neutralrots drückt sich im Grad ihrer Rotfärbung aus.

**Schema zur Beurteilung des Grades der Rotfärbung:**

|      |   |                               |
|------|---|-------------------------------|
| ++++ | = | rot                           |
| +++  | = | rosa                          |
| ++   | = | schwach rosa                  |
| +    | = | sehr schwach rosa             |
| -    | = | farblos, Eigenfarbe der Keime |

Um möglichst objektive Farbeindrücke zu erhalten, ist es notwendig, eine Vergleichsmöglichkeit zu haben. Deshalb wurde der Test vergleichend bei den pathogenen und apathogenen Mycobakterien durchgeführt.

## b) Versuchsergebnisse

Das färberische Verhalten der Keime der einzelnen Stämme ist in Tabelle 4 zusammengefaßt. Jeder Stamm wurde zweimal getestet.

Tabelle 4 Zusammenstellung der Ergebnisse des Neutralrottests

| Stämme                                                        | Neutralrottest<br>Kult. 3 W. alt | Neutralrottest<br>Kult. 5 W. alt |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <u>Tuberkelbakterien</u>                                      |                                  |                                  |
| Hu 39 (human)                                                 | +++                              | +                                |
| Hu 144B "                                                     | ++++                             | -                                |
| Bov 110M (bovin)                                              | ++++                             | ++                               |
| Bov 204MS "                                                   | ++++                             | +                                |
| <u>Geflügeltuberkelbakterien</u>                              |                                  |                                  |
| Av 1                                                          | ++                               | -                                |
| Av 2                                                          | ++                               | +                                |
| Av 4                                                          | ++                               | -                                |
| Av 5                                                          | +++                              | ++                               |
| Av 6                                                          | +++                              | +                                |
| Av 7                                                          | ++                               | -                                |
| Av 8                                                          | +++                              | +                                |
| Av 9                                                          | ++                               | +                                |
| Av 11                                                         | ++                               | +                                |
| Av 204                                                        | +++                              | -                                |
| Av 178                                                        | ++                               | ++                               |
| Av-Qu4                                                        | +++                              | +                                |
| Av 33                                                         | ++                               | -                                |
| Da 38                                                         | +++                              | +                                |
| 131-A-Ka                                                      | ++                               | +                                |
| 99-Ka                                                         | ++                               | ++                               |
| W                                                             | ++                               | +                                |
| 97-Ka                                                         | ++                               | ++                               |
| <u>Paratuberkelbakterien</u>                                  |                                  |                                  |
| III                                                           | ++                               | +                                |
| IV                                                            | +++                              | ++                               |
| V                                                             | ++                               | +                                |
| 3384                                                          | +++                              | -                                |
| C. Hull                                                       | ++                               | +                                |
| C. 286                                                        | ++                               | ++                               |
| II/28/5.                                                      | +++                              | +                                |
| C. 300                                                        | +++                              | ++                               |
| 3390                                                          | ++                               | +                                |
| <u>Apathogene Mycobakt. Kult. 4 Tg. alt, Kult. 14 Tg. alt</u> |                                  |                                  |
| 1                                                             | -                                | -                                |
| 2                                                             | -                                | -                                |
| 3                                                             | -                                | -                                |
| 4                                                             | -                                | -                                |
| 5                                                             | -                                | -                                |
| 6                                                             | -                                | -                                |
| 7                                                             | -                                | -                                |
| 8                                                             | -                                | -                                |
| 9                                                             | -                                | -                                |
| 10                                                            | -                                | -                                |

Die Untersuchungen zeigten, daß alle untersuchten pathogenen Mycobakterien-arten Neutralrot-positiv reagierten. Apathogene Mycobakterien besaßen diese Fähigkeit nicht. Die Farbmenge, die von den einzelnen Arten der pathogenen Mycobakterien gebunden wurde, war nicht konstant, sondern hing stark vom Alter der Keime ab.

Was die Differenzierungsmöglichkeiten betraf, so ergab sich, daß es mit Hilfe des Neutralrottests nur möglich ist, pathogene Mycobakterien von apathogenen abzutrennen. Ein signifikanter Unterschied im Verhalten der pathogenen Mycobakterienarten, insbesondere im Unterschied zwischen Paratuberkelbakterien, Geflügeltuberkelbakterien und Säugetiertuberkelbakterien, bestand nicht.

#### D. Die Züchtung von Mycobakterium paratuberculosis und der Erreger der Warmblütertuberkulose in der "Tiefenkultur" unter Beachtung ihrer kulturellen Differenzierungsmöglichkeit

Die submerse Tuberkelbakterienzüchtung aus Untersuchungsmaterial von tuberkulösen Menschen wurde von Herrmann (27) angegeben und ihre Vorteile gegenüber der Oberflächenzüchtung auf festen Nährböden herausgestellt. Joppich (30) züchtete aus Material von tuberkulösen Hühnern mit Hilfe des Tiefenkulturverfahrens nach Herrmann und des Oberflächenverfahrens nach Petragnaní Geflügeltuberkelbakterien. Es zeigte sich dabei, daß die Tiefenkultur diagnostisch leistungsfähiger ist als die mikroskopische Untersuchung und als die Oberflächenkultur.

In einem weiteren Versuch sollte deshalb geprüft werden, ob die Tiefenkultur zur Züchtung von Laborstämmen von Mycobakterium paratuberculosis geeignet ist und ob sie eine Möglichkeit zur Differenzierung von den Tuberkelbakterien bildet.

##### a) Material und Methodik

Es fanden 9 Paratuberkulose-, 15 Geflügel-, 2 humane und 2 bovine Stämme Verwendung, die auf Petragnaninährböden gezüchtet worden waren.

Als flüssiger Nährboden wurde das Nährmedium nach Sauton verwendet, das folgendermaßen zusammengestellt ist:

|               |       |
|---------------|-------|
| Asparagin     | 4 g   |
| Zitronensäure | 2 g   |
| $K_2HPO_4$    | 0,5 g |

|                                                                     |                               |
|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Ferriammonzitrat                                                    | 0,05 g                        |
| Magnesiumsulfat                                                     | 0,5 g                         |
| Glyzein                                                             | 20 g                          |
| Aq. dest. ad.                                                       | 1000 g                        |
| Mit $\text{NH}_4\text{OH}$ einstellen auf $\text{p}_\text{H} = 7,2$ |                               |
| Sterilisieren im Autoklaven                                         | 40 Minuten bei 0,5 Atü = 110° |

Von jedem Stamm wurde eine Keimaufschwemmung (ca. 20 mg/ccm) hergestellt und davon jeweils 2 Ösen überimpft. Die beimpften Röhrchen wurden bei 38° C bebrütet.

#### b) Versuchsergebnis

Das erste Wachstum der Paratuberkelbakterien war frühestens nach 8 - 10 Tagen sichtbar. Nach 12 - 14 Tagen waren 2 Wuchsformen zu unterscheiden, die denen der Geflügeltuberkelbakterien stark ähnelten. Ein geringer Unterschied zeigte sich bei der flockigen Wuchsform. Hier waren nach dem Aufschütteln die Partikelchen im allgemeinen mehr körnig und größer als bei den Geflügeltuberkelbakterien. Die "Nestbildung" in der Kuppe war nicht so stark ausgeprägt und das Wachstum in Form von Belägen an der Kuppenwand war häufiger (6 von 9 untersuchten Stämmen bildeten Beläge).

Bei älteren Kulturen (3 - 4 Wochen) kam es zu keiner Bildung von Schleimzöpfen. Alle Kulturen hatten im ganzen in diesem Wachstumsstadium einen körnig flockigen Charakter.

Das erste mikroskopisch erkennbare Wachstum zeigte sich bei Geflügelbakterien frühestens nach 4, spätestens nach 7 Tagen. Nach 8 - 10 Tagen ließen sich im wesentlichen 2 Wuchsformen unterscheiden. Sie sind aber nicht scharf voneinander abgegrenzt und können nebeneinander in dem gleichen Röhrchen vorkommen und ineinander übergehen.

Bei der ersten Form wuchsen die Kulturen in grau-weißen, aufgelockerten, wolken- oder moosähnlichen Nestern in der Kuppe des Gläschens. Diese Nester verfielen beim Aufschütteln in kleine körnige oder flockige Teilchen. Die am Anfang des Wachstums zerschüttelten Kulturen sanken zu Boden und bildeten einen festen Belag, der nun beim Aufschütteln nicht mehr ganz den Zusammenhang verlor, sondern einen dicken Schleimzopf bildete. Die Kulturen zeigten im ganzen einen flockigen Charakter.

Bei der zweiten Wuchsform bildete sich von vornherein ein dünner, zusammenhängender Belag, der die Reagenzglaskuppe bedeckte und entweder allein für sich oder zusammen mit der ersten Wuchsform ausgebildet war. Beim Aufschüt-

tehn bemerkte man zarte Schlieren, aus denen sich später typische Schleimzöpfe bildeten. Hier hatten die Kulturen im allgemeinen ein schleimiges Aussehen. Von den 15 untersuchten Stämmen wuchsen 9 in der schleimigen und 6 in der mehr flockigen Form.

Die humanen und bovinen Stämme zeigten ihr erstes Wachstum nach 14 - 18 Tagen. In der Art des Wachstums in der Tiefenkultur mit Sautons Nährflüssigkeit scheinen keine auffallenden Typenunterschiede zu bestehen. Am Boden des Reagenzgläschens bildeten sich kleine Kolonien, die eigenartig netzförmig, unregelmäßig strukturiert aussahen. Sie wuchsen rasch, behielten aber die typische Struktur bei. Trotz energischem Schütteln gelang es nicht, die von der Kuppe des Gläschens aufwirbelnden brockigen Kulturteilchen zu zerkleinern. Brachte man diese Kulturbröckchen mit Hilfe einer Öse auf einen Objektträger, so zeigte sich, daß sie sehr hart waren und sich deswegen schwer zerreiben ließen.

#### Differenzierungsmöglichkeit

Wie in den vorhergegangenen Versuchen zeigten die Paratuberkelbakterien eine auffallende Verwandtschaft mit Geflügeltuberkelbakterien. Eine Ähnlichkeit im kulturellen Verhalten in der Tiefenkultur trat vor allem bei jungen Kulturen, ungefähr bis zum Alter von 10 - 14 Tagen, auf, da ein Teil der Geflügeltuberkelbakterienstämme das gleiche flockige bzw. körnige Wachstum aufwies. Erst nach längerer Bebrütung, nach ca. 3 - 4 Wochen, bildeten die Geflügeltuberkelbakterien die typischen Schleimzöpfe, während die Paratuberkelbakterien ihr flockiges bzw. körniges Wachstum beibehielten.

Eine Differenzierung 16 - 20 Tage alter Paratuberkelbakterienkulturen von gleichaltrigen humanen und bovinen Kulturen ist wegen des körnigen Aussehens der aufgeschüttelten Kulturen nicht mit Sicherheit vorzunehmen. Jedoch können die Paratuberkel- von den humanen und bovinen Stämmen dadurch abgetrennt werden, daß man auf einem Objektträger die Härte der Kulturbröckchen prüft. Die Paratuberkelbakterienkolonien sind leicht, die der humanen oder bovinen Kulturen kaum oder sehr schwer zu verreiben.

#### IV. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Auf Grund der Wachstumsgeschwindigkeit und des sonstigen kulturellen Verhaltens ließen sich Laborstämme von Paratuberkelbakterien und Geflügeltuberkelbakterien gegenüber humanen und bovinen Tuberkelbakterien in der Makrokultur auf Petagnani- und Gottsackernährböden im allgemeinen abtrennen. Eine kulturelle Differenzierung der Paratuberkelbakterien von den Geflügeltuberkelbakterien war auf diesen Nährböden nur dann möglich, wenn letztere die für sie charakteristische, aber nicht konstante Ringbildung zeigten.
2. Auf Membranfiltern ließen sich Paratuberkelbakterien und andere Mycobakterien am besten züchten, wenn der Nährboden kein Malachitgrün enthielt. Malachitgrün wird im Filter angereichert und hemmt dadurch das Keimwachstum.

Die Paratuberkelbakterien zeigten bei mikroskopischer Betrachtung als gemeinsame Wuchsform das "orientierte" Wachstum nach Hellmann. Aber auch von den Geflügeltuberkelbakterien wiesen 2/3 der Stämme eine solche Wuchsform auf. Humane und bovine Tuberkelbakterien waren deutlich an ihrer ausgeprägten Zopfbildung zu erkennen.

3. Im Neutralrottest nach Dubos ließen sich Paratuberkelbakterien von Geflügel- und Säugetiertuberkelbakterien nicht abgrenzen.
4. In der "Tiefenkultur" unter Verwendung der Sautonschen Nährflüssigkeit wuchsen die Paratuberkelbakterien in Form eines flockigen oder auch körnigen Bodensatzes, der sich im Gegensatz zu den Tiefenkulturen humaner und boviner Tuberkelbakterien auf einem Objektträger mit der Öse leicht zerreiben ließ. Geflügeltuberkelbakterien waren nach 3 - 4-wöchiger Bebrütung in der Regel an der Bildung von zusammenhängenden Schleimzöpfen zu erkennen.

#### Schlußfolgerung

Paratuberkelbakterien, die sich an Nährmedien ohne Zusatz von Mycobakterium phlei gewöhnt haben, können gewöhnlich kulturell von humanen und bovinen Tuberkelbakterien ohne Schwierigkeit differenziert werden. Eine Unterscheidung von Geflügeltuberkelbakterien gelingt nur, wenn die aviären Stämme auf festen Nährböden die charakteristische Ringbildung oder in der flüssigen Tiefenkultur Schleimzöpfe zeigen.

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. Albrecht, B. und E. Nagel: Zur Kultur des Bacterium paratuberculosis auf Hohns Substrat 4.  
Zbl. Bakt., I.  
Abt. Orig. 150, 1/2, 53 (1943)
2. Andersen, C. W.: Om Dyrkning af Paratuberkelbazillen og Forsoeg med Paratuberkulin.  
Maanedsskrift for Dyrslaeger, 32, 113 (1920)
3. Bang, B.: Die chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rind,  
TW 759 (1906)
4. Behrens, H.: DTW 129 (1955)
5. Bergey: Bergeys Manual of Determinative.  
Bact. 6, Ed. Williams and Wikins Comp.,  
Baltimore (1948)
6. Bloch, H.: Studies on the virulence of tubercle bacilli:  
Isolation a. biological properties of a constituent of virulent organism.  
J. Exper. Med. 91, 197 (1950)
7. Bloch, H. and H. Noll: Variations in virulence effected by Tween  
80 a. thiosemicarbazone.  
J. Exp. Med. 97, 1 (1953)
8. Bloch, H., E. Sorkin and H. Erlenmeyer: A toxic lipid component of the tubercle  
bacillus (cord factor).  
Am. Rev. Tub. 67, 629 (1953)
9. Bongert, A.: Bakt. Diagnose für Tierärzte und Studierende.  
Berlin: R. Schoetz 1927
10. Derselbe: Die spezifische chronische Enteritis des Rindes.  
DTW 1906, S. 229
11. Boquet, A.: (zit. Vet. Med. 47, 842 (1928)  
Sur bacille de l'enterite paratuberc. des bovides.  
Ann. de l'inst. Pasteur 42, 495 - 528

12. Brugge und Albien: Vorlesungs-Mitteilungen über die ent. chron. pseudotuberc.  
BTW 1908, S. 175
13. Buchanan, G.: The neutral red cytochem. test for determining the vir. of mycobact. with observ. on its modif. safric.  
J. M. Sc. 20, 73 (1955)
14. Dunkin, G. W.: The preparat. of Johnin from a synthetic medium without the addit. of bact. phlei. 1933
15. Derselbe: Paratuberc. of cattle a. sheep. Proc. of the Royal. Soc. of Med. 30 (1936)
16. Fadyean, Mc: The histology of the lesions of Johnes's disease.  
J. comp. Path. a. Ther. 31, 73 (1918)
17. Francis, J., H. M. Macturk, I. Madinaveitia, G. A. Snow: Biochem. J. 55, 596 (1953)
18. Francis, J.: Bericht - Vorbereitet durch das Vet. Laboratorium Weybridge im Namen des Europäischen Produktivitätsausschusses der Europäischen Organisation für wissenschaftliche Zusammenarbeit.
19. Friedmann, A., K. Russell: Serpiginous Growth of tubercle bacilli in media, containing embryonic tissue.  
J. Path. a. Bact. 65, 495 (1953)
20. Gardner, Middlebrook and R. I. Dubos: Cytochem. reakt. of virul. tub. bac.  
Am. Rev. Tuberc. 58, 698 (1948)
21. Goldman, E. C. and D. S. Goldman: The Indic. of cording in an avirul. Variant of Mycobakt.  
Am. Rev. Tuberc. 73, 674 (1956)
22. Dieselben: Cording a. neutral red reakt. of 2 avir. strains of mycobakt.  
Am. Rev. Tuberc. 73, 674 (1956)
23. Hallmann, L.: Bakt. Nährböden.  
Thieme-Verlag Stuttgart 1953
24. Hauduroy, D. et Y. Posternak-Gallia: Sur une reactione cytochemique en rapport avec la viul. des mycobact.  
Ann. Inst. Pasteur 77, 91 (1949)

25. Hein: Untersuchungen von Mycobakterien mit dem Neutralrottest.  
Zbl. Bakt. Ref. I, 156, 332 (1955)
26. Hellmann, E.: Wachstumsformen von Mycobakterien auf Mikrokulturen.  
Z. V. M. 2, 629 (1955)
27. Herrmann, W.: Die Kultivierung der Tuberkelbakterien mittels flüssiger, modifizierter Kirchner-Substrate.  
Z. Hyg. 129, 102 (1949)
28. Holth, H.: Reinzüchtung der spez. chron. Darmentzündung des Rindes.  
Z. inf. Krkh. Haust. II, 5 (1912)
29. Johne und Frothingham: D. Z. Tiermed. u. Path. 21, 438 (1895)
30. Joppich, H.: Über die Eignung der Tiefenkultur zum Nachweis der Geflügeltuberkelbakterien.  
Diss. Gießen 1951
31. Lange, L.: Die Tuberkelbazillen.  
Zbl. Bakt. I. Orig. 127, 15 (1933)
32. Lange, L. und H. Peskatore: Beobachtung über die Gewinnung und das Verhalten von Reinkulturen der Paratuberkelbakterien.  
Zbl. Bakt. I Orig. 140 (1937)
33. Meyer, K. F.: The special paratuberculosis enteritis of cattle in America.  
J. Med. Vet. 29, 147 (1913)
34. Meyer, K. H.: Über den Nachweis der Erreger der Paratuberkulose im Kot und Darm erkrankter Tiere und Züchtung der Paratuberkelerreger mit Hilfe des Antiforminverfahrens.  
Diss. Hannover 1926
35. Meyn, A.: Nachweis und Typendifferenzierung der Tuberkelbakterien.  
BMTW 1941, S. 607
36. Meyn, A. und R. Nestle: Über Zopfbildung in Mikrobakterienkulturen.  
BMTW 1952, S. 187

37. Middlebrook, G., R.I. Dubos and C.H. Pierce:  
Virulence a, morphological characteristics of  
mammalian tubercle bacilli.  
J.Exp. Med. 86, 175 (1947)
38. Mießner, H. und  
Berge:  
Die Paratuberkulose des Rindes. Kolle Kraus  
Uhlenhut: Handbuch der path. Mikroorganismen  
6, 679 (1928)
39. Noll, H., H. Bloch, J. Asselineau and E. Lederer:  
zit. Zbl. Tuberk. 73, 337 (1956/57)
40. Petraghani, G.:  
Al une utili modifikationi al mio terreno ed  
alla technica per Pisolamento in coltura pura  
dei Bacilli do Koch dagli escreati e da altri  
materiali tubercolari. Boll. Ist. sieroterap.  
Milano 1926, 173, Vo. 15  
Zbl. Bakt. I. Ref. 85, 540 (1927)
41. Pescatore, H.:  
Weiterzüchtung von 14 Paratuberkelbakterien-  
stämmen.  
BMTW 6, 72 (1949)
42. Philpot, F.J. and  
A.Q. Wells:  
Lipids of living and killed tubercle bacilli.  
Am. Rev. Tbc. 66, 28 (1952)
43. Pierce, C.H., R.I. Dubos and G. Middlebrook:  
Infection of mice with mammalian tubercle  
bacilli grown in Tween-albumin liquid medium.  
J. Exp. Med. 86, 159 (1947)
44. Pokorny, J. und  
J. Kristufkova:  
Untersuchung über den Lipoidfaktor der Virulenz  
des Mycobacterium tuberculosis.  
Zbl. Tbc. 72, 169 (1956)
45. Popp, P.:  
Züchtungs- und Infektionsversuche mit Para-  
tuberkelbakterien.  
Diss., Leipzig 1940
46. Rinjard, P.:  
Prophylaxie de l'infection de l'enterite para-  
tuberculeuse des bovides. Comp. rend. de la  
conf. tenue à Rouen. Juni 1935
47. Smith, H.W.:  
Source of the phlegm growth factor for myco-  
bacterium Johnei.  
Nature, London, 175, 40 (1955)

48. Schrodter, S.: Beobachtungen bei Anwendung des Neutral-  
rottestes nach Dubos.  
Zbl. Bakt. I Orig., 164 (1955)
49. Soskin, E., H. Erlenmeyer und H. Bloch:  
Purification of a lipid material (cord factor)  
obtained from young cultures of tubercle bacilli.  
Nature, 170, 4316 (1952)
50. Twort, F.A. and  
G.L.Y. Ingram: Further Experiments on the biology of John's  
bacillus.  
Zbl. Bakt. I. Orig. 73, 277 (1914)
51. Dieselben: A method for isolating and cultivating the  
mycobacterium enteritidis chronicae pseudo-  
tuberculosis bovis Johne.  
Proc. Roy. Soc. B. Vol. 84 (1912)
52. Viallier, J., J. Kalb et J. Tiguaud: Sur la coloration par le rouge  
neutral du bacille tuberculeux.  
C. r. Soc. Biol. 144, 1513 (1950)
53. Wayne, L.G.: Cultivation a. visualisation of mycobacteria  
on molekular filter membrans.  
J. Bact. 69, 92 (1955)
54. Wooley, Mc Carter: zit. nach Hutyra Marek Manninger und Mocsy.  
Spez. Path. u. Ther. d. Haustiere 10, I. Bd., 727

Es ist mir eine angenehme Pflicht,  
Herrn Professor Dr. A. Meyn meinen  
Dank zu sagen für die Überlassung des  
Themas.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Assisten-  
ten Dr. Th. Schließer für die Anregun-  
gen zur Gestaltung der Arbeit und für die  
Durchsicht des Manuskriptes.

## L E B E N S L A U F

Am 28. Juni 1931 wurde ich in Bobingen als Sohn des Schafzüchters Engelbert Fiehl und dessen Ehefrau Therese, geb. Seidel, geboren.

Die Volksschule besuchte ich in Kleinaitingen, wechselte 1947 zur Oberrealschule Ingolstadt über, wo ich 1952 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1952/53 begann ich mit dem tiermedizinischen Studium, das ich nach 9 Semestern im Juli 1957 mit dem Staatsexamen abschloß.

Am 15. Juni 1958 erhielt ich die Bestallungs-  
urkunde.





